



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 41 04 128 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁵:
G 01 N 33/577
C 12 Q 1/48
// C12Q 1/28, C12N
5/12

DE 41 04 128 A 1

②1 Aktenzeichen: P 41 04 128.3
②2 Anmeldetag: 12. 2. 91
④3 Offenlegungstag: 12. 3. 92

③0 Unionspriorität: ③2 ③3 ③1
01.07.90 DD WP G 01 N/342372

⑦1 Anmelder:
Zentralinstitut für Molekularbiologie, O-1115 Berlin,
DE

⑦2 Erfinder:
Noll, Franz, Prof. Dr.; Handschack, Wilhelm, Dr.;
Löster, Clemens; Hofmann, Ute; Rabitzsch, Georg,
Prof. Dr.; Krause, Ernst-Georg, Prof. Dr., O-1115
Berlin, DE

⑤4 Immunezymometrischer Assay (IEMA) zur immunochemischen Bestimmung von Glykogenisophosphorylase BB (GP-BB), Verfahren zur Herstellung und Verwendung des IEMA

⑤7 Die Erfindung betrifft einen immunezymometrischen Assay (IEMA) zur quantitativen Bestimmung von Glykogenisophosphorylase BB (GP-BB), seine Herstellung und Verwendung. Die Erfindung ist in der medizinischen Diagnostik und in der Enzymtechnik anwendbar.
Im Assay kommen nach dem Zwei-Seiten-Bindungsprinzip zwei monoklonale Antikörper gegen GP-BB zur Anwendung, die keinerlei Kreuzreaktivität mit den Isoenzymen MM und LL der Glykogenisophosphorylase BB aufweisen. Zur Beschichtung der festen Phase wird der Antikörper VID12 eingesetzt, der monoklonale Antikörper IIF11 wird mit Meerrettich-Peroxidase (POD) markiert. Die diese Antikörper produzierenden Hybridome sind in der Hinterlegungsstelle im Zentralinstitut für Molekularbiologie der Akademie der Wissenschaften der DDR in Berlin hinterlegt.
Durch eine optimale Stabilisierung der beschichteten festen Phase und durch haltbare Positiv- und Negativkontrollen beträgt die Verwendbarkeit des Assays mindestens ein halbes Jahr. Der Test zeichnet sich durch leichte Handhabbarkeit aus, die GP-BB läßt sich auch in Gegenwart der Isoenzyme MM und LL mit hoher Empfindlichkeit und Präzision in Körperflüssigkeiten bestimmen. Die Testzeit beträgt zur Feindiagnostik 90 Minuten und zur Schnelldiagnostik 30 Minuten.

DE 41 04 128 A 1

Die Erfindung betrifft einen IEMA zur immunchemischen Bestimmung von GP-BB in Körperflüssigkeiten, vor allem im Blut, dessen Herstellung und Verwendung. Die Erfindung ist in der medizinischen Diagnostik und in der Enzymtechnik anwendbar.

Glykogenisosphosphorylase b (EC 2.4.1.1.) kommt im menschlichen Organismus vorzugsweise im Skelett- und Herzmuskel sowie in der glatten Muskulatur, der Leber und in Leukozyten vor und kann in die Isoenzyme B, M, L unterteilt werden. Die natürlicherweise auftretenden Dimere der Glykogenphosphorylase haben entsprechend die Zusammensetzung BB, MM, LL und gewisse Mischformen. Für den Herzmuskel typisch ist das Isoenzym BB, obwohl auch MM in geringer Konzentration vorliegt. In Abhängigkeit von der Stoffwechselsituation ist das Enzym aus einer strukturgebundenen Zellkomponente in ein zytosolisch gelöstes Protein überführbar. Bei entsprechender metabolischer Schädigung des Herzmuskels wird das Enzym aus den Myozyten freigesetzt und erscheint im Blut (Schulze, W., E.-G. Krause und A. Wollenberger: J. Mol. Cell. Cardiol. 2, 241—251 [1971]; G. Rabitzsch, E.-G. Krause und L. Will-Shahab: Gutachten zur Wertigkeit der Glykogenphosphorylase b in der serologischen Diagnostik des aktuellen Herzinfarktes, Zentralinst. f. Herz-Kreislauf-Forschung der AdW der DDR, 1979). Dieses Phänomen läßt sich für die Diagnostik ischämischer Herzkrankheiten ausnutzen. Obwohl diese Tatsache schon lange bekannt war, gehört die Konzentrationsmessung der Glykogenphosphorylase b noch nicht zu den diagnostischen Routinemethoden.

Das bisher verwendete Bestimmungsverfahren beruht auf dem Nachweis der Enzymaktivität im menschlichen Serum (Krause, E.-G., H. Will, M. Böhm, A. Wollenberger: Clin. Chim. Acta 58, 145—154 [1975]). Dieser Test ist in seiner Durchführung für klinische Routine-Untersuchungen auf Grund seiner Kompliziertheit nicht einsetzbar. Außerdem ist eine Diskriminierung zwischen dem Isoenzym BB und MM nicht möglich, da nicht das Enzym selbst, sondern seine Aktivität gemessen wird. Eine Verbesserung der Bestimmungsmethode wurde durch die Einführung der spezifischen Immunhemmung entweder des Isoenzym BB oder des Isoenzym MM mittels entsprechender polyklonaler Antikörper des Kaninchens erreicht (Rabitzsch, G., H. Schulz, K. Onnen, A. Kössler und E.-G. Krause: Biomed. Biochim. Acta 46, S. 584—588 [1987]; Rabitzsch, G., A. Kössler und E.-G. Krause: Zeitschr. Laboratoriumstechnik [1988]). Jedoch ist dieser Test nicht empfindlich genug, beruht auf nicht standardisierbaren Testbestandteilen, wie polyklonale Antikörper, und ist als Routinetest ungeeignet. Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen GP-BB, beschrieben im DD-WP 2 42 750 und 2 74 054 zur Verwendung für die quantitative Bestimmung von GP-BB in Körperflüssigkeiten, ist inzwischen bekannt. Das im DD-WP 2 74 098 beschriebene immunenzymometrische Verfahren zur Konzentrationsbestimmung des Enzyms, z. B. im Blut, erfolgt nach dem 2-Seiten-Bindungsprinzip. Hier werden 10 Antikörperpaare vorgeschlagen. Mit diesen Antikörperkombinationen in dem beschriebenen Testverfahren gelingt eine präzise Qualifizierung von GP-BB auch in Gegenwart hoher Konzentration des Isoenzym MM, da die Antikörper keine Kreuzreaktion mit dem Isoenzym MM aufweisen. Nachteile dieses Verfahrens nach WP 2 74 098 sind jedoch:

- Kreuzreaktion einiger dort beanspruchter Ak mit dem Isoenzym LL der Glykogenphosphorylase. Diese Kreuzreaktion führt möglicherweise zur falschen Interpretation der erhaltenen Werte (Fehldiagnose z. B. Herzinfarkt — Leberschädigung),
- Reproduzierbarkeit nicht mit allen dort aufgeführten Ak-Paaren ausreichend wegen unterschiedlicher Stabilität der Ak,
- mit der im DD-WP 2 74 098 vorgeschlagenen Lösung ist eine problemlose Behandlung des Patientenmaterials nicht möglich,
- Stabilisierung der mit Ak beschichteten festen Phase nicht optimal gelöst,
- Positivkontrolle (Standardwerte) und Negativkontrolle nicht optimal auf Grund fehlender Haltbarkeit und Vergleichbarkeit mit zu testenden Proben,
- Produktivität der zur Gewinnung der für den IEMA benötigten monoklonalen Antikörper erforderlichen Hybridome z. T. zu gering, um für die Routinediagnostik eingesetzt werden zu können,
- Höhe der Blindwerte für die Auswertung zu hoch.

Die Erfindung hat das Ziel, einen optimalen Assay zur quantitativen Bestimmung von GP-BB zu entwickeln, der für das Isoenzym BB der Glykogenphosphorylase absolut spezifisch ist und eine präzise Bestimmung auch in Anwesenheit der Isoenzyme MM oder LL erlaubt, der eine feste Reproduzierbarkeit gewährleistet, eine leichte Herstellbarkeit und Handhabbarkeit des Testes und des Patientenmaterials sowie eine lange Verwendbarkeit des Tests einschließt und sowohl zur Fein- als auch zur Schnelldiagnostik einsetzbar ist.

Aufgabe der Erfindung ist es, zunächst zwei stabile Hybridome zu finden, die Antikörper mit solchen konstanten Eigenschaften — ohne Kreuzreaktion mit dem Isoenzym MM und LL — in großer Menge produzieren, daß sie auch zur Schnelldiagnostik geeignet sind und der damit hergestellte Testkit in seinem Variationskoeffizienten internationalen Anforderungen entspricht. Außerdem ist die mit einem Antikörper beladene feste Phase optimal zu stabilisieren. Gleichmaßen sind haltbare Positiv- und Negativkontrollen herzustellen, so daß die Verwendbarkeit des Assays mindestens ein halbes Jahr beträgt. Der Testablauf und die Lösungen für die Stabilisierung, für die Blockierung freier Proteinbindungsstellen auf der mit Antikörpern besetzten festen Phase, für die Verdünnung des Antikörper-Enzym-Konjugates sind so zu gestalten, daß der Test so kurz als möglich ist und mit einem sehr niedrigen Blindwert verbunden ist.

Die Aufgabe wird gelöst, indem zur immunchemischen Bestimmung von GP-BB ein Assay eingesetzt wird, der besteht aus einer mit einem monoklonalen Antikörper gegen GP-BB beschichteten und stabilisierten festen Phase, einem zweiten monoklonalen Antikörper gegen GP-BB, der mit einem Enzym markiert ist (Antikörper-Enzym-Konjugat), einer Lösung zum Aufnehmen des Antikörper-Enzym-Konjugates, den Positivkontrollen (Standardproben), der Negativkontrolle, einem Chromogen, einem Enzymsubstrat, einem Substratpuffer zum Aufnehmen von Enzymsubstrat und Chromogen sowie Säure zum Abstoppen der Farbreaktion.

Erfindungsgemäß wird als monoklonaler Antikörper, mit dem die feste Phase beschichtet wird, der Antikörper IVD12 (produziert durch die Hybridomzelllinie

ZIM-0326) ausgewählt. Die Stabilisierung der beschichteten festen Phase erfolgt erfindungsgemäß mit einer Pufferlösung, die 2—7 Massenanteile in % Zucker, 0,3—0,8 Massenanteile in % Schutzprotein, 0,01—0,03 Massenanteile in % einer bakterioziden Substanz und 0,02—0,1 Volumenanteile in % Detergens enthält. Vorzugsweise werden als Zucker 5 Massenanteile in % Saccharose, als Schutzprotein 0,5 Massenanteile in % Rinderserumalbumin, als bakteriozide Substanz 0,02 Massenanteile in % Merthiolat und als Detergens 0,05 Volumenanteile in % Tween 20 eingesetzt.

Der zweite, mit Peroxidase (POD) markierte monoklonale Antikörper ist erfindungsgemäß der Antikörper IIF11 (produziert durch die Hybridomzelllinie ZIM-0329). Beide Hybridomzelllinien sind in der Hinterlegungsstelle im Zentralinstitut für Molekularbiologie der Akademie der Wissenschaften der DDR unter den o. g. Registriernummern hinterlegt. Es handelt sich hier um zwei stabile Hybridome, die Antikörper mit konstanten Eigenschaften und in guten Ausbeuten produzieren. Überraschenderweise gehen nur die von diesen beiden Hybridomen produzierten monoklonalen Antikörper keine Kreuzreaktionen mit dem Isoenzym LL der Glykogenphosphorylase ein. Die Lösung zum Aufnehmen (Verdünnen) des Antikörper-IIF11-POD-Konjugates ist eine Pufferlösung, die 5—15, vorzugsweise 10, Volumenanteile in % normales Kälberserum, 0,02—0,1 Volumenanteile in % Detergens, vorzugsweise 0,05 Volumenanteile Tween 20, und 2—7, vorzugsweise 4, mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA) enthält.

Die Negativkontrolle besteht in GP-BB-freiem EDTA-Plasma (Nullplasma). Die Positivkontrollen enthalten unterschiedliche Standardkonzentrationen an GP-BB, aufgenommen in Nullplasma und lyophilisiert. Sie können aus 2—8 Standardproben mit bekanntem Gehalt an GP-BB bestehen.

Die Pufferlösung der Stabilisierungslösung und der Lösung zum Aufnehmen des Antikörper-IIF11-POD-Konjugates ist PBS (phosphate buffered saline: 0,02 M Na-Phosphate pH 7,3 und 0,154 M NaCl).

Die feste Phase ist entweder eine Mikrotestplatte, ein Mikroteststreifen, ein Teststäbchen oder eine Testkugel.

Das zu bestimmende Blut ist vorzugsweise Plasma und enthält 3—7 mM EDTA. Weiterhin enthält das Testbesteck in seiner Vorzugsvariante das Enzymsubstrat H_2O_2 (30%ig), das Chromogen (o-Phenylendiamin oder Tetramethylbenzidin) sowie die Stopplösung (2,5 N H_2SO_3). Die Pufferlösung zum Aufnehmen des Enzymsubstrates und des Chromogens besteht aus: 0,2 M Na_2HPO_4 , 0,07 M Zitrat pH 5,0. Das Testbesteck enthält demnach die mit dem ersten Antikörper beschichtete feste Phase in luftdichter Verpackung, die Negativ- und Positivkontrollen als Lyophilisat, das Antikörper-POD-Konjugat, die Pufferlösung zum Aufnehmen des Konjugates, Wasser zum Aufnehmen der Kontrollen, die Pufferlösung zum Aufnehmen des Chromogens und des Substrates sowie die Stopplösung.

Die Herstellung des immunenzymometrischen Assays (IEMA) zur Bestimmung von GP-BB in Körperflüssigkeiten, vorzugsweise Blut, erfolgt, wie aus dem Stand der Technik bekannt, indem man eine feste Phase mit einem monoklonalen Antikörper gegen GP-BB beschichtet und danach stabilisiert, einen zweiten monoklonalen Antikörper gegen GP-BB mit einem Enzym markiert (Antikörper-Enzym-Konjugat), eine Lösung zum Aufnehmen des Antikörper-Enzym-Konjugats bereitet, eine Substratlösung, bestehend aus Chromogen, Enzymsubstrat und Substratpuffer, Negativkontrolle

und Positivkontrollen sowie Säure zum Stoppen der Farbreaktion herstellt. Erfindungsgemäß wird die feste Phase, die eine Mikrotestplatte, ein Mikroteststreifen, ein Teflonstäbchen oder eine Testkugel sein kann, mit dem monoklonalen Antikörper VID12 (ZIM-0326) beschichtet, indem sie mit dem in Lösung befindlichen Antikörper in Kontakt gebracht wird und die Adsorption des mAk an die feste Phase innerhalb von 12 Stunden in einer feuchten Kammer bei 4°C (z. B. im Kühlschrank) oder durch Antrocknen bei 37°C innerhalb von weniger als 16 Stunden erfolgt. Als Lösung zum Aufnehmen des monoklonalen Antikörpers ist PBS gut geeignet. Anschließend wird erfindungsgemäß die beschichtete feste Phase durch mehrstündige Inkubation, vorzugsweise 2 Stunden bei Raumtemperatur, mit einer Pufferlösung stabilisiert, die enthält 2—7 Massenanteile in % Zucker, vorzugsweise 5 Massenanteile in % Saccharose, 0,3—0,8 Massenanteile in % Schutzprotein, vorzugsweise 0,5 Massenanteile in % Rinderserumalbumin, 0,01—0,03 Massenanteile in % einer bakterioziden Substanz, vorzugsweise 0,02 Massenanteile in % Merthiolat, und 0,02—0,1 Volumenanteile in % eines Detergens, vorzugsweise 0,05 Volumenanteile in % Tween 20. Schließlich wird zur Aufbewahrung der mit dem Antikörper beschichteten und stabilisierten festen Phase diese sorgfältig getrocknet und in Folie zusammen mit einem Trockenmittel (z. B. Filterpapier) luftdicht eingeschweißt. Der erfindungsgemäß zweite Antikörper IIF11 (produziert durch die Hybridomzelllinie ZIM-0329) wird nach bekanntem Verfahren mit Meerrettich-Peroxidase (POD) markiert. Das entstandene Antikörper IIF11-POD-Konjugat wird für seine Verwendung im Test in einer Pufferlösung aufgenommen, die folgende Bestandteile enthält, 5—15, vorzugsweise 10, Volumenanteile in % normales Kälberserum, 0,02—0,1 Volumenanteile in % Detergens, vorzugsweise 0,05 Volumenanteile in % Tween 20, und 2—7, vorzugsweise 4, mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA). Als Pufferlösung zur Stabilisierung der beschichteten festen Phase und zum Aufnehmen des Antikörper-IIF11-POD-Konjugates ist PBS (phosphate buffered saline) gut geeignet.

Als Negativkontrolle wird GP-BB-freies EDTA-Plasma (Nullplasma) bereitet und lyophilisiert. Die Positivkontrollen (= Standardwerte) enthalten GP-BB in definierter Konzentration, aufgenommen in Nullplasma, und werden zwecks besserer Lagerfähigkeit lyophilisiert.

Die Verwendung des immunenzymometrischen Assays (IEMA) für die quantitative Bestimmung von GP-BB in Körperflüssigkeiten, vorzugsweise Blut, erfolgt, wie aus dem Stand der Technik bekannt, indem man die Reaktionsflächen einer mit einem monoklonalen Antikörper gegen GP-BB beschichteten und stabilisierten festen Phase mit den zu bestimmenden Proben, einer Negativkontrolle und Positivkontrollen in Kontakt bringt, alle Kontrollen und Proben mit einem zweiten, in Lösung befindlichen monoklonalen Antikörper gegen GP-BB, der mit einem Enzym markiert ist (Antikörper-Enzym-Konjugat) inkubiert, danach mit einer Substratlösung aus Chromogen, Enzymsubstrat und Substratpuffer inkubiert, die Reaktion durch Zugabe von Säuren stoppt und schließlich die Enzymaktivität photometrisch, fluorometrisch oder luminometrisch bestimmt. Erfindungsgemäß wird der oben beschriebene IEMA mit den zwei ausgewählten monoklonalen Antikörpern und der speziellen Stabilisierungslösung und der speziellen Lösung zum Aufnehmen des Antikörper-POD-Konjugats eingesetzt. Die zu bestimmenden Blutproben

werden als Plasma eingesetzt, das 3–7 mM EDTA enthält. Erfindungsgemäß erfolgt die Inkubation mit dem Antikörper-POD-Konjugat in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur innerhalb von 90 Minuten zur Feindiagnostik oder auch nur innerhalb von 30 Minuten zur Schnelldiagnostik.

Der beschriebene immunenzymometrische Test beinhaltet bekannte Verfahrensmerkmale wie das Zwei-Seiten-Bindungsprinzip, die Enzymmarkierung monoklonaler Antikörper und die Messung der Enzymaktivität. Die erreichte untere Nachweisgrenze von 0,5 ng/ml Probe und der Testbereich von 0,5 ng/ml bis ca. 100 ng/ml entsprechen dem Stand der Technik.

Die Vorteile dieses Tests gegenüber dem Stand der Technik bestehen in der Auswahl von zwei monoklonalen Antikörpern, die keinerlei Kreuzaktivität mit den Isoenzymen MM und LL der Glykogenphosphorylase aufweisen, in der hervorragenden Reproduzierbarkeit der Testwerte auf Grund der besonderen Stabilität des ausgewählten Antikörperpaares, in der verbesserten Patientenprobenvorbereitung mit erleichterter Handhabung, in der guten Lagerbarkeit der Testbestandteile durch die erfindungsgemäße Stabilisierung, in der hohen Produktivität der die ausgewählten mAk produzierenden Hybridomzelllinien und schließlich in der geringen Höhe des Blindwertes. Die Verwendbarkeit des Assays beträgt mindestens ein halbes Jahr.

Dieses Testverfahren ist durch leichte Handhabbarkeit, gegeben durch ein optimales Testherstellungsverfahren, geeignet, die Glykogenisophosphorylase BB auch in Gegenwart der Isoenzyme MM und LL mit hoher Empfindlichkeit und Präzision in Körperflüssigkeiten bestimmen zu können. In seinem Varianzkoeffizienten entspricht der Assay internationalen Anforderungen (s. Abb. 1 – Standardkurve). Die Erfindung soll an Ausführungsbeispielen noch näher erläutert werden, ohne sie einzuschränken.

Ausführungsbeispiele

1. Immunenzymometrischer Assay (IEMA) zur quantitativen Bestimmung von Glykogenisophosphorylase BB (GP-BB)

Als feste Phase werden die Näpfe von 96-er-Mikrotestplatten (MTP) verwendet, die mit dem monoklonalen Antikörper VID12 vorbeschichtet sind. Nach Entfernen der MTP aus der luftdichten Verpackung und Auflösen der Lyophilisate der Negativkontrolle und der Positivkontrollen (6 Standardwerte) in Wasser werden Näpfe mit je 50 µl der zu messenden Proben (z. B. EDTA-Plasma), mindestens zwei Näpfe mit je 50 µl der Negativkontrolle (Nullplasma) sowie jeweils zwei Näpfe mit 50 µl der gleichen Konzentration der Positivkontrollen (insgesamt 6) gefüllt. Jedem Napf werden dann 50 µl des in einer Pufferlösung (PBS mit 10% Volumenanteile normales Kälberserum, 0,05% Volumenanteile Tween 20, 4 mM an EDTA) vorverdünnten Antikörper-IIF11-POD-Konjugates zugegeben.

Die sich anschließende Inkubation von 90 min erfolgt bei Zimmertemperatur in einer feuchten Kammer auf einem Schüttler. Danach wird gründlich mit Wasser gewaschen und die Substratlösung (Phosphat (0,2 M Na_2HPO_4)-Zitrat (0,07 M)-Puffer, pH 5,0 mit 0,40 mg o-Phenylendiamin pro ml sowie 0,02% Volumenanteile an H_2O_2) (200 µl/Napf) zugegeben.

Nach einer Inkubation von 15 min bei Zimmertemperatur im Dunkeln werden jedem pro Napf 50 µl 2,5 N

H_2SO_4 zugeführt. Die Intensität der entstandenen Färbung wird schließlich photometrisch bei der Wellenlänge von 492 nm gemessen.

Aus der gemessenen Extinktion wird an Hand der mittels der Standardwerte (Positivkontrollen) erstellten Eichkurve der GP-BB-Gehalt einer Probe ermittelt (siehe Standardkurve Abb. 1).

2. Herstellung eines IEMA zur quantitativen Bestimmung von GP-BB

Die Näpfe einer Mikrotestplatte als feste Phase werden mit je 100 µl Antikörper-VID12-Lösung (5 µg Antikörper pro ml PBS) gefüllt. Die Beschichtung mit dem Antikörper erfolgt durch Adsorption an die Wände der MTP-Näpfe über 12 Stunden bei 4°C. Danach wird die Lösung entfernt und 200 µl einer Stabilisierungslösung (5% Massenanteile Saccharose, 0,5% Massenanteile Rinderserumalbumin, 0,02% Massenanteile Merthiolat und 0,05% Volumenanteile an Tween 20) werden zugegeben. Nach 1 Stunde Inkubation wird die Lösung gründlich entfernt, die MTP erst bei 37°C, dann bei Zimmertemperatur im Vakuum getrocknet. Die völlig trockenen, mit dem Antikörper beschichteten MTP werden dann in Folie unter Zusatz eines Filterpapierstreifens luftdicht verpackt und so bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

Die Herstellung der Negativkontrollen (Nullplasma EDTA-Plasma frei von GP-BB) erfolgt durch spezifische Entfernung der in physiologischen Konzentrationen im Blut vorkommenden GP-BB und abschließender Lyophilisation zu 150 µl pro Ampulle.

Die Positivkontrollen (sechs: 160, 80, 40, 20, 10, 5 ng/ml) werden durch Substitution von Nullplasma mit aus menschlichem Herzmuskel präparierter GP-BB in definierten Konzentrationen hergestellt. Von jeder Positivkontrolle werden 150 µl pro Ampulle lyophilisiert.

Das Antikörper-IIF11-POD-Konjugat wird nach üblichen Verfahren entweder über SPDP- oder Perjodat-Kopplung hergestellt. Die Stammlösung in Testbesteck enthält ca. 200 µg Antikörper-IIF11-POD-Konjugat pro ml, 10% Volumenanteile normales Kälberserum, 0,05% Volumenanteile Tween 20 und 4 mM EDTA in PBS.

Zur Herstellung der Arbeitsverdünnung der Antikörper IIF11-POD-Konjugat-Stammlösung wird ein Puffer folgender Zusammensetzung verwendet: PBS mit 10% Volumenanteilen normales Kälberserum, 0,05% Volumenanteile Tween 20 und 4 mM EDTA.

Dem Testbesteck werden zusätzlich in jeweils getrennten Ampullen o-Phenylendiamin, H_2O_2 und 2,5 N H_2SO_4 zugegeben.

3. Verwendung des IEMA zur quantitativen Bestimmung von GP-BB im Blut

Vom Patienten wird Blut entnommen, dem sofort EDTA bis zur Konzentration von 4 mM zugesetzt wird, damit eine Gerinnung verhindert wird. Nach Abzentrifugieren der Blutzellen entsteht EDTA-Plasma, das direkt in den IEMA eingesetzt wird. In die Näpfe einer mit dem Antikörper VID12 beschichteten MTP werden 50 µl der Plasmaproben (in jeweils Zwei-Doppel-Bestimmungen!) eingefüllt. Gleichzeitig werden zwei Näpfe mit je 50 µl Nullplasma (Negativkontrolle) und zwölf weitere mit je 50 µl der sechs Positivkontrollen beschichtet, nachdem die Lyophilisate mit dem entsprechenden Volumen an H_2O_2 aufgelöst worden waren. Den Proben, Negativ- und Positivkontrollen werden

dann nach Herstellung der entsprechenden Arbeitsverdünnung des Antikörper-IIF11-POD-Konjugates jeweils 50 µl davon zugesetzt. Es schließt sich eine Inkubation von 60 min bei Zimmertemperatur in einer feuchten Kammer auf einem Schüttler an. Danach wird mit Wasser gründlich gewaschen und die Näpfe vollständig geleert und die Substratlösung (200 µl/Napf) zugegeben. Nach einer Inkubation von 15 min bei Zimmertemperatur im Dunkeln werden pro Napf 50 µl 2,5 N H₂SO₄ zur Abstopfung der Farbreaktion zugefügt. Die Intensität der entstandenen Färbung wird in einem Photometer bei der Wellenlänge = 492 nm gemessen. An den Mittelwerten der gemessenen Extinktionen der Doppelbestimmungen wird mittels der im gleichen Test ermittelten Eichkurve (sechs Standardwerte als Positivkontrolle) der GP-BB-Gehalt des bestimmten Patientenplasmas ermittelt (siehe Standardkurve mit Probe Abb. 2).

Patentansprüche

1. Immunenzymometrischer Assay (IEMA) zur immunchemischen Bestimmung von Glykogenisophosphorylase BB (GP-BB) im Blut, bestehend aus

- einer mit einem monoklonalen Antikörper gegen GP-BB beschichteten und stabilisierten festen Phase,
- einem zweiten monoklonalen Antikörper gegen GP-BB, der mit einem Enzym markiert ist (Antikörper-Enzym-Konjugat),
- einer Lösung zum Aufnehmen des Antikörper-Enzym-Konjugats,
- Positivkontrollen (Standardproben),
- Negativkontrolle,
- einem Chromogen,
- einem Enzymsubstrat,
- einem Substratpuffer zum Aufnehmen von Enzymsubstrat und Chromogen,
- Säure zum Stoppen der Farbreaktion,

gekennzeichnet dadurch, daß zur Bestimmung von GP-BB im Blut

- der monoklonale Antikörper, mit dem die feste Phase beschichtet ist, der Antikörper VID12 (produziert durch die Hybridomzelllinie ZIM-0326) ist und die Stabilisierung der beschichteten festen Phase mit einer Pufferlösung erfolgt ist, die
- 2—7 Massenanteile in % Zucker,
- 0,3—0,8 Massenanteile in % Schutzprotein,
- 0,01—0,03 Massenanteile in % bakteriozide Substanz,
- 0,02—0,1 Volumenanteile in % Detergens enthält,
- der zweite, mit Peroxidase (POD) markierte monoklonale Antikörper der Antikörper IIF11 (produziert durch die Hybridomzelllinie ZIM-0329) ist,
- die Lösung zum Aufnehmen des Antikörper-IIF11-POD-Konjugats eine Pufferlösung ist, die
- 5—15 Volumenanteile in % normales Kälberserum,
- 0,02—0,1 Volumenanteile in % Detergens und
- 2—7 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA) enthält,
- die Negativkontrolle GP-BB-freies EDTA-Plasma (Nullplasma) ist,
- die Positivkontrollen jeweils in Nullplasma

aufgenommen sind.

2. IEMA nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß die Pufferlösung zur Stabilisierung der beschichteten festen Phase als Zucker 5 Massenanteile in % Saccharose, als Schutzprotein 0,5 Massenanteile in % Rinderserumalbumin, als bakteriozide Substanz 0,02 Massenanteile in % Merthiolat und als Detergens 0,05 Volumenanteile in % Tween 20 enthält.

3. IEMA nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß die Pufferlösung zum Aufnehmen des Antikörper-IFF11-POD-Konjugats 10 Volumenanteile in % normales Kälberserum als Detergens 0,05 Volumenanteile in % Tween 20 und 4 mM EDTA enthält.

4. IEMA nach Anspruch 1—3, gekennzeichnet dadurch, daß die Pufferlösung zur Stabilisierung der beschichteten festen Phase und zum Aufnehmen des Antikörper-IIF11-POD-Konjugats PBS (phosphate buffered saline) ist.

5. IEMA nach Anspruch 1, 2 und 4, gekennzeichnet dadurch, daß die feste Phase eine Mikrotestplatte, ein Mikroteststreifen, ein Teststäbchen oder eine Testkugel ist.

6. IEMA nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß das zu bestimmende Blut 3—7 mM EDTA enthaltendes Plasma ist.

7. Verfahren zur Herstellung eines immunenzymometrischen Assays (IEMA) zur Bestimmung von Glykogenisophosphorylase BB (GP-BB) im Blut, indem man eine feste Phase mit einem monoklonalen Antikörper gegen GP-BB beschichtet und danach stabilisiert, einen zweiten monoklonalen Antikörper gegen GP-BB mit einem Enzym markiert (Antikörper-Enzym-Konjugat), eine Lösung zum Aufnehmen des Antikörper-Enzym-Konjugats bereitet, eine Substratlösung, bestehend aus Chromogen, Enzymsubstrat und Substratpuffer, Negativkontrolle und Positivkontrollen sowie Säure zum Stoppen der Farbreaktion herstellt, gekennzeichnet dadurch, daß man die feste Phase mit dem monoklonalen Antikörper VID12 (produziert durch die Hybridomzelllinie ZIM-0326) beschichtet, die beschichtete feste Phase durch mehrstündige Inkubation mit einer Pufferlösung stabilisiert, die

2—7 Massenanteile in % Zucker,

0,3—0,8 Massenanteile in % Schutzprotein,

0,01—0,03 Massenanteile in % bakteriozide Substanz,

0,02—0,1 Volumenanteile in % Detergens enthält,

den monoklonalen Antikörper IFF11 (produziert durch die Hybridomzelllinie ZIM-0329) mit Peroxidase (POD) markiert, eine Pufferlösung zum Aufnehmen des Antikörper-IIF11-POD-Konjugats herstellt, die

5—15 Volumenanteile in % normales Kälberserum,

0,02—0,1 Volumenanteile in % Detergens und

2—7 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA) enthält,

als Negativkontrolle GP-BB-freies EDTA-Plasma (Nullplasma) bereitet und Positivkontrollen herstellt, die jeweils in Nullplasma aufgenommen werden.

8. Verfahren nach Anspruch 7, gekennzeichnet dadurch, daß man zur Beschichtung der festen Phase diese mit dem in Lösung befindlichen monoklonalen Antikörper VID12 in Kontakt bringt und die Adsorption des monoklonalen Antikörpers an die

festen Phase innerhalb von 12 Stunden in einer feuchten Kammer bei 4°C oder durch Antrocknen bei 37°C innerhalb von weniger als 16 Stunden ablaufen läßt.

9. Verfahren nach Anspruch 7, gekennzeichnet dadurch, daß man die beschichtete feste Phase zur Stabilisierung 2 Stunden bei Raumtemperatur mit einer Pufferlösung inkubiert, die als Zucker 5 Massenanteile in % Saccharose, als Schutzprotein 0,5 Massenanteile in % Rinderserumalbumin, als bakteriozide Substanz 0,02 Massenanteile in % Mertioliat und als Detergens 0,05 Volumenanteile in % Tween 20 enthält, und danach die beschichtete und stabilisierte feste Phase vollständig trocknet.

10. Verfahren nach Anspruch 7—9, gekennzeichnet dadurch, daß man die beschichtete und stabilisierte feste Phase zusammen mit Trockenmittel in Folie luftdicht einschweißt.

11. Verfahren nach Anspruch 7—10, gekennzeichnet dadurch, daß man als feste Phase eine Mikrottestplatte, einen Mikrotteststreifen, ein Teflonstäbchen oder eine Testkugel einsetzt.

12. Verfahren nach Anspruch 7, gekennzeichnet dadurch, daß man die Pufferlösung zum Aufnehmen des Antikörper-IIF11-POD-Konjugats mit 10 Volumenanteilen in % normalem Kälberserum, 0,05 Volumenanteilen in % Tween 20 als Detergens und

4 mM EDTA herstellt.

13. Verfahren nach Anspruch 7, 9, 12, gekennzeichnet dadurch, daß man als Pufferlösungen zur Stabilisierung der beschichteten festen Phase und zum Aufnehmen des Antikörper-IIF11-POD-Konjugats PBS (phosphate buffered saline) einsetzt.

14. Verwendung eines immunenzymometrischen Assays (IEMA) zur immunochemischen Bestimmung von Glykogenisophosphorylase BB (GP-BB) im Blut, indem man die Reaktionsflächen einer mit einem monoklonalen Antikörper gegen GP-BB beschichteten und stabilisierten festen Phase mit den zu bestimmenden Blutproben, einer Negativkontrolle und Positivkontrollen in Kontakt bringt, alle Kontrollen und Proben mit einem zweiten, in Lösung befindlichen monoklonalen Antikörper gegen GP-BB, der mit einem Enzym markiert ist (Antikörper-Enzym-Konjugat) inkubiert, danach mit einer Substratlösung aus Chromogen, Enzymsubstrat und Substratpuffer inkubiert, die Reaktion durch Zugabe von Säuren stoppt und schließlich die Enzymaktivität photometrisch, fluorometrisch oder luminometrisch bestimmt, gekennzeichnet dadurch, daß der IEMA gemäß Anspruch 1 eingesetzt wird, die zu bestimmenden Blutproben als EDTA-Plasma eingesetzt werden und die Inkubation mit dem Antikörper-Enzym-Konjugat in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur innerhalb von 90 min zur Feindiagnostik oder innerhalb von 30 min zur Schnell Diagnostik erfolgt.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

60

65

Abbl. 1

Nummer:

Int. Cl.⁵:

Offenlegungstag:

DE 41 04 128 A1

G 01 N 33/577

12. März 1992

GP BB-IEMA Standardkurve (SUMAL)

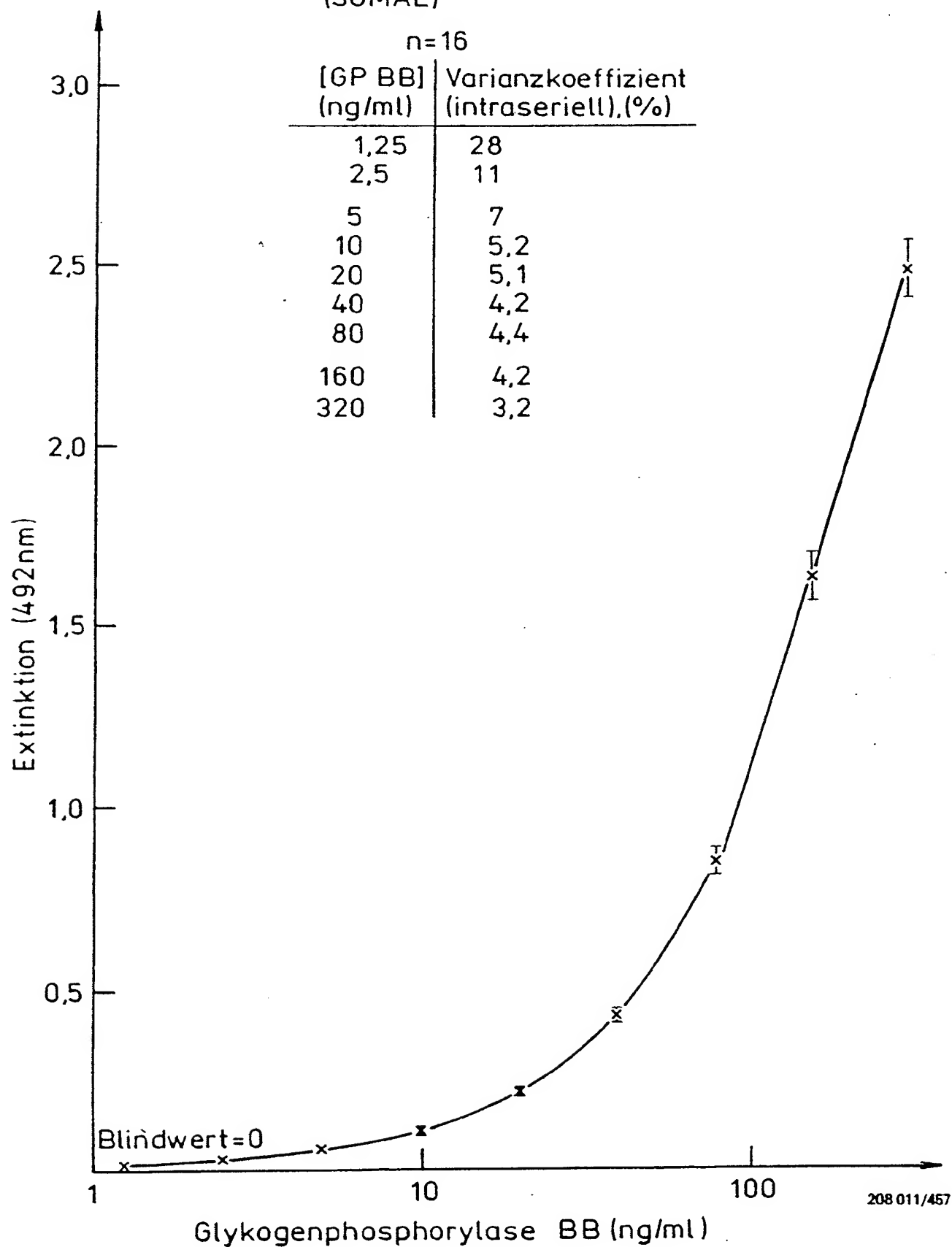


Abb. 2

GP BB-IEMA
Patient N.R.
(SUMAL)

Nummer:

Int. Cl. 5:

Offenlegungstag:

DE 41 04 128 A1

G 01 N 33/577

12. März 1992

